










**DIALOGWEB.**       

Guided Search [new search](#) [favorites](#) [settings](#) [cost](#) [logoff](#) [help](#)

Dynamic Search: JAPIO - Patent Abstracts of Japan

Records for: JP 9121855 [save as alert...](#) [save strategy only...](#)

Output  Format:  Output as:  [display/send](#)

Modify  [refine search](#) [back to picklist](#)

Records 1 of 1 In full Format

☐ 1. 4/19/1  
05507055 \*\*[image available]\*\*  
NEW ALKALI PROTEASE AND ITS PRODUCTION

Pub. No.: 09-121855 [ JP 9121855 A ]

Published: May 13, 1997 (19970513)

Inventor: MORIYAMA YASUSHI

MANSEI SHINJI

YOSHIZUMI NORISHIGE

MURANO HITOMI

OSAKI ARIYOSHI

Applicant: TOTO LTD [001008] (A Japanese Company or Corporation), JP (Japan)

Application No.: 07-322535 [JP 95322535]

Filed: November 02, 1995 (19951102)

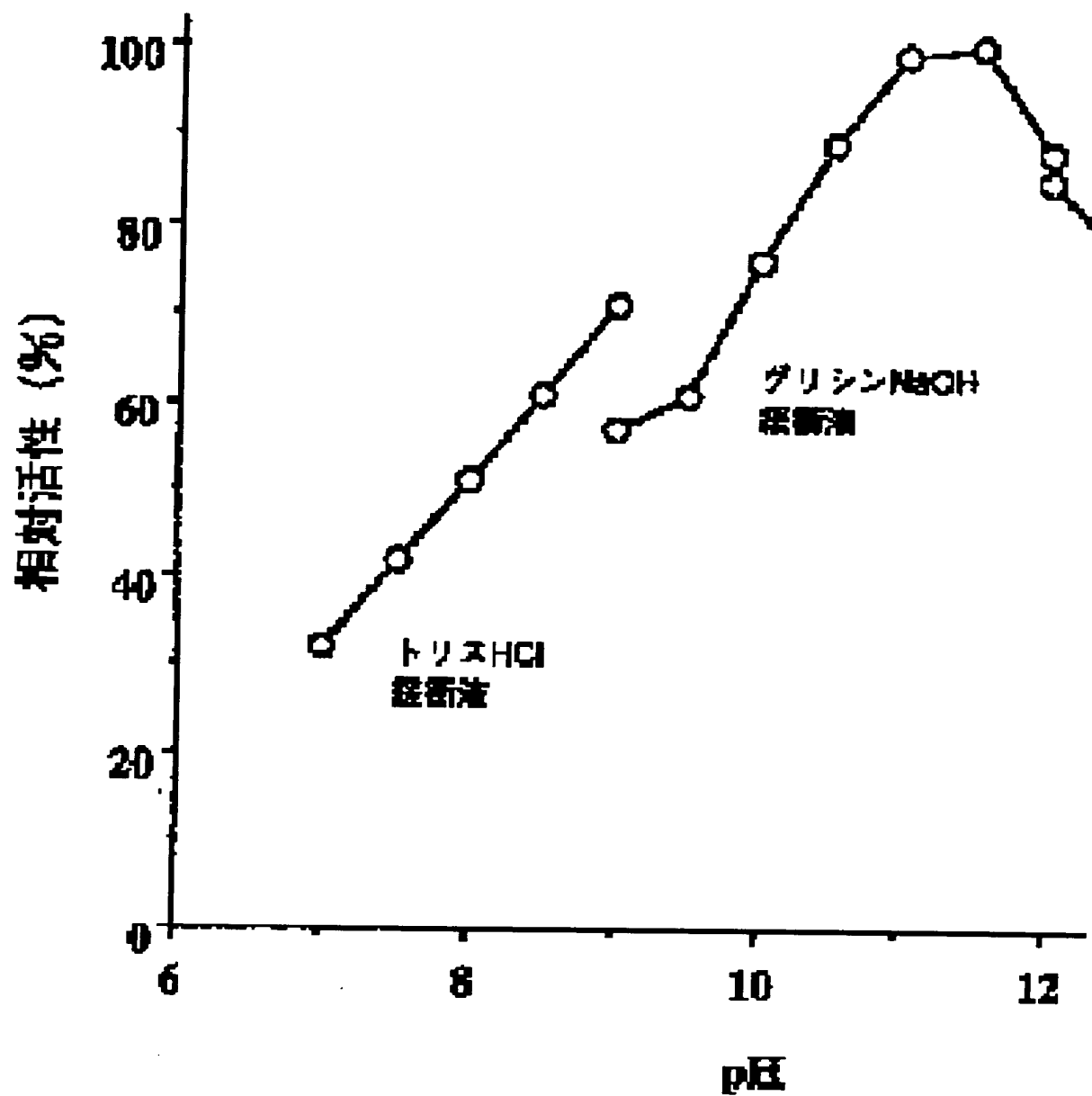
International Class: [ 6 ] C12N-009/52; C12N-001/20; C12N-009/52; C12R-001/465; C1  
001/465

JAPIO Class: 14.5 (ORGANIC CHEMISTRY -- Microorganism Industry); 14.6 (ORGANIC C  
Fuel, Oils & Fats)

#### ABSTRACT

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain a new alkali protease having high activity not only a  
but also against insoluble proteins such as keratin.

SOLUTION: This new alkali protease has the following physicochemical characteristics; (a)  
specificity: acting on various proteins such as casein, gelatin, gluten, hemoglobin and insuli  
oligopeptides and amino acids by endo-type-hydrolyzing the peptide linkages; in particular  
insoluble proteins such as keratin on which conventional enzymes have been hard to act.;  
11.5 in the case of casein as substrate; and (c) specific activity: 214,000 (U/mg protein) fc  
(U/mg protein) for keratin.



JAPIO (Dialog® File 347): (c) 2001 JPO & JAPIO. All rights reserved.

(19) 日本国特許庁 (J P)

## (12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平 9 - 1 2 1 8 5 5

(43) 公開日 平成 9 年 (1997) 5 月 13 日

(51) Int. Cl. <sup>6</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C12N 9/52			C12N 9/52	
1/20			1/20	A
//(C12N 9/52				
C12R 1:465 )				
(C12N 1/20				

審査請求 未請求 請求項の数 7 書面 (全 8 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平 7 - 3 2 2 5 3 5

(22) 出願日 平成 7 年 (1995) 11 月 2 日

(71) 出願人 0 0 0 0 1 0 0 8 7

東陶機器株式会社

福岡県北九州市小倉北区中島 2 丁目 1 番 1 号

(72) 発明者 森山 康司

福岡県北九州市小倉北区中島 2 丁目 1 番 1 号 東陶機器株式会社内

(72) 発明者 満生 慎二

福岡県北九州市小倉北区中島 2 丁目 1 番 1 号 東陶機器株式会社内

(72) 発明者 吉住 典恵

福岡県北九州市小倉北区中島 2 丁目 1 番 1 号 東陶機器株式会社内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】新規アルカリプロテアーゼおよびその製造法

(57) 【要約】

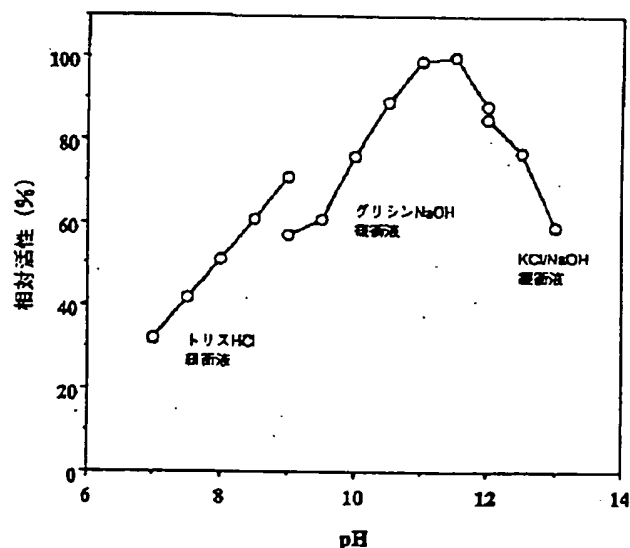
【目的】 可溶性タンパク質のみならず、ケラチンなどの不溶性タンパク質に対しても強力な活性を有する新規アルカリプロテアーゼを提供する。

【構成】 下記の理化学的性質を有するアルカリプロテアーゼ。

(a) 作用および基質特異性: カゼイン、ゼラチン、グルテン、ヘモグロビン、インシュリンなどの各種タンパク質に作用し、そのペプチド結合をエンド的に加水分解してオリゴペプチドおよびアミノ酸を生成する。特に、従来の酵素では作用し難かったケラチン等の不溶性タンパク質に対しても、強力に加水分解する。

(b) 最適 pH: 最適 pH はカゼインを基質とした場合、11.0 ~ 11.5 である。

(c) 比活性: カゼインに対しては 214,000 (U/mg タンパク)、ケラチンに対しては 52,700 (U/mg タンパク) である。



## 【特許請求の範囲】

【請求項1】下記の理化学的性質を有するアルカリプロテアーゼ

(a) 作用および基質特異性：各種タンパク質およびペプチドに特異的に作用し、そのペプチド結合をエンド型の機作により切断して、低分子量のオリゴペプチドおよびアミノ酸を生成する。また特に従来のプロテアーゼでは分解が困難であったケラチンなどの不溶性タンパク質についても高い活性を示す。

(b) 最適pH：最適pHはカゼインを基質とした場合、11.0～11.5である。

(c) 安定pH：30℃、24時間の処理条件において、pH1.5～12.0で安定である。

(d) 最適温度：最適作用温度は70～75℃である。

(e) 安定温度：pH7.0、10分間の処理条件において、カルシウム無添加の場合は55℃、カルシウムを添加した場合は60℃まで安定である。

(f) 分子量：約56,000 (SDS電気泳動法)である。

(g) 等電点：約10～10.5 (等電点電気泳動法)である。

(h) 比活性：カゼインを基質とした場合は214,000 (U/mgタンパク)、ケラチンを基質とした場合は52,700 (U/mgタンパク)である。

(i) 阻害：PCMB (バククロマーキュリーベンゾエイト)、ヨード酢酸、EDTA (エチレンジアミン四酢酸)では活性は阻害されないが、DFP (ジイソプロピルフルオロホスフェート)、PMSF (フェニルメタンシルフオニルフルオリド)では阻害される。

【請求項2】好アルカリ性放線菌ストレプトミセス (*Streptomyces*) 属菌から得られる、請求項1記載のプロテアーゼ。

【請求項3】ストレプトミセス エスピー (*Streptomyces* sp.) TOTO-9305株から得られる、請求項1記載のプロテアーゼ。

【請求項4】好アルカリ性ストレプトミセス属に属し、請求項1記載のアルカリプロテアーゼ産生能を有する微生物を培養する工程と、該工程で得られた培養物より該アルカリプロテアーゼを分離する工程とを含んでなる、アルカリプロテアーゼの製造法。

【請求項5】前期微生物の培養がpH8.0～13.0のアルカリ性で行われる、請求項4記載の製造法。

【請求項6】前記微生物がストレプトミセス エスピー TOTO-9305株である請求項4記載のプロテアーゼ製造法。

【請求項7】ストレプトミセス エスピー TOTO-9305株 (FERM P-13640)。

## 【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、新規なアルカリプロ

テアーゼおよびその製造法ならびに該アルカリプロテアーゼ産生能を有する新規好アルカリ性放線菌に関する。

【0002】

【従来の技術】アルカリプロテアーゼはタンパク質のペプチド結合をアルカリ領域において特異的に加水分解する酵素であり、食品、繊維、皮革、洗剤等の工業において広く利用されている。このようなアルカリプロテアーゼは糸状菌、酵母、細菌等の微生物により広く生産されることが知られており、またいわゆる好アルカリ性微生物と呼ばれる一群の微生物によっても生産される。

【0003】前述された好アルカリ性微生物から生産されるアルカリプロテアーゼとしては、いわゆる好アルカリ性バチルス属菌から得られる酵素 (例えば、特公平7-63366、特公平7-63367、特公平7-63368等) が多数既に知られており、主に洗剤用として開発が進められている。また、同様な好アルカリ性バチルス属菌から得られる耐熱性酵素として、AH-101株の生産するアルカリプロテアーゼ (特開平2-255087) およびB18-1株の生産するアルカリプロテアーゼ (特公平7-63368) 等が知られている。しかしながら、同じ好アルカリ性微生物である好アルカリ性放線菌の産生するプロテアーゼについてはあまり知られておらず、わずかに好アルカリ性ストレプトミセス属菌由来の酵素 (Agr. Biol. Chem., 38 (1) 37-44, 1974) ならびに好アルカリ性サーモアクチノミセス属HS682株のアルカリプロテアーゼ (Biosci. Biotech. Biochem., 56 (2), 246-250, 1992) 等が報告されているにすぎない。

【0004】一方、洗剤用にプロテアーゼを応用する場合、ケラチン等の不溶性タンパク質に対しても良好に作用する酵素が望ましいことが指摘されている (皆川基：繊維誌、第26巻、322頁、(1985))。もちろん、この場合においてもカゼイン等の可溶性タンパク質を強力に分解できなければならないことは当然である。また、プロテアーゼを浴槽や浴床排水溝あるいは洗面化粧台ドレインの洗浄剤に応用する場合は、40℃前後の中温で十分な活性を保持し、かつ毛髪、垢などのケラチンを強力に分解する能力が要求される。現状の洗剤および洗浄剤は、配合組成の関係からそのpHがアルカリ領域にあることから、配合する酵素はアルカリプロテアーゼが最適である。

【0005】さらに、ケラチンを主要タンパク質とする毛髪、羽毛等は化学合成が不可能なアミノ酸であるシステインの製造原料として重要である。現状では毛髪等を酸加水分解処理し、化学的反応によりシステインを製造している。しかしながら、過激な反応条件のため蓄量のシステインが分解されてしまい、収量が極めて悪いため、プロテアーゼ処理等の温和な加水分解方法が望まれ

ていた。この場合においても、ケラチンが高アルカリ領域において膨潤し酵素の作用を受けやすくなるという性質から、加水分解剤としての酵素はアルカリプロテアーゼが最適である。

【0006】このような用途に対して、先述のAH-101株および好アルカリ性ストレプトミセス属菌由来のアルカリプロテアーゼの有用性が提案されている。しかしながら、特にケラチンの分解力において両酵素ともその実用化に対しては不十分であり、さらに強力なケラチン分解力を有する新規なアルカリプロテアーゼの開発が望まれていた。

【0007】上記のような観点から、発明者らは強力なケラチン分解力を有するアルカリプロテアーゼを生産する微生物を主に好アルカリ性放線菌を中心として検索した結果、好アルカリ性のストレプトミセス属に属する放線菌1株が、好氣的培養により目的とする新規アルカリプロテアーゼを効率良く生産することを見出し、本発明を完成するに至った。

【0008】

【発明が解決しようとする課題】したがって本発明は、特にケラチンのような不溶性タンパク質をも強力に加水分解できる、新規なアルカリプロテアーゼを提供することを目的としている。

【0009】また本発明は、上記アルカリプロテアーゼを生産する新規微生物およびその微生物を利用した上記アルカリプロテアーゼの製造法を提供することを目的としている。

【0010】

【課題を解決するための手段】本発明による新規アルカリプロテアーゼは、以下のような理化学的性質を有するもの、である。

【0011】(a)作用および基質特異性：各種タンパク質およびペプチドに特異的に作用し、そのペプチド結合をエンド型の機作により切断して、低分子量のオリゴペプチドおよびアミノ酸を生成する。また特に従来のプロテアーゼでは分解が困難であったケラチンなどの不溶性タンパク質についても高い活性を示す。

(b)最適pH：最適pHはカゼインを基質とした場合、11.0～11.5である。

(c)安定pH：30℃、24時間の処理条件において、pH1.5～12.0で安定である。

(d)最適温度：最適作用温度は70～75℃である。

(e)安定温度：pH7.0、10分間の処理条件において、カルシウム無添加の場合は55℃、カルシウムを添加した場合は60℃まで安定である。

(f)分子量：約56,000(SDS電気泳動法)である。

(g)等電点：約10～10.5(等電点電気泳動法)

である。

(h)比活性：カゼインを基質とした場合は214,000(U/mgタンパク)、ケラチンを基質とした場合は52,700(U/mgタンパク)である。

(i)阻害：PCMB(パラクロロマーリユリーベンゾエイト)、ヨード酢酸、EDTA(エチレンジアミン四酢酸)では活性は阻害されないが、DFP(ジイソプロピルフルオロホスフェート)、PMSF(フェニルメタンスルフォニルフルオリド)では阻害される。

【0012】また、本発明による上記新規アルカリプロテアーゼの製造法は、好アルカリ性ストレプトミセス属に属し、上記アルカリプロテアーゼ産生能を有する微生物を培養する工程と、該工程で得られる培養物より該新規アルカリプロテアーゼを分離する工程を含んでなるもの、である。さらにまた、本発明による上記新規アルカリプロテアーゼ産生能を有する新規菌株は、ストレプトミセス エスピー TOT-9305株(FERM P-13640)である。

【0013】本発明によるアルカリプロテアーゼは比活性が極めて高く、特に従来のプロテアーゼでは分解されにくかったケラチン等の不溶性タンパク質をも、強力に加水分解する。したがって、衣料用洗剤や柔軟剤に洗浄効果を高める目的で配合されたり、浴槽、浴室排水溝、洗面化粧台ドレインなどの閉塞除去剤に添加されれば、極めて効果的である。さらに、ケラチンを主要タンパク質とする毛髪、羽毛等からのシステインなどのアミノ酸製造にも応用が可能であり、広範囲の工業分野で利用され得る。また、本発明による菌株は、上記アルカリプロテアーゼを効率良く菌体外に分泌するので、簡便な工程で高効率にその生産を行うことができる点で有利である。

【0014】新規アルカリプロテアーゼ産生菌株

本発明による新規アルカリプロテアーゼは、微生物を用いて生産することができる。特に好ましくは、本発明によるアルカリプロテアーゼは、好アルカリ性ストレプトミセス属、特にストレプトミセス エスピー(*Streptomyces* sp.) TOT-9305株により生産される。この菌株は発明者らにより、北九州市の一般家屋浴室のタイル目地上より分離されたものである。この菌株は好アルカリ性放線菌であり、次の表1及び表2に示す菌学的性質を有する。なお、本菌株は好アルカリ微生物であり、通常の中性培地では生育しないか、あるいは生育が極めて不良であるため、表1及び表2の菌学的性質の検討に際しては0.5%Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>添加のアルカリ性培地を用いた。

【0015】

【表1】

## 菌学的諸性質

諸 性 質	TOTO-9305 株
形態	
1) 胞子形成菌糸の分岐法および形態	単純分枝・直状
2) 胞子の連鎖数	10 胞子以上 (10~50 胞子)
3) 胞子の表面構造及び大きさ	平滑: $1.0 \mu\text{m} \times 0.5 \mu\text{m}$
4) 鞭毛の有無	無
5) 胞子のうの有無	無
6) 胞子柄の着生位置	気菌未上
生理的性質	
1) 生育温度範囲 / pH	15~45℃ / pH 7.5~13
2) ゼラチンの液化	少々する (4 日で液化する)
3) スターチの加水分解	加水分解する
4) 脱脂牛乳の凝固およびペプトン化	凝固しない: 5 日でペプトン化する
5) メラニン様色素の生成	生成しない
各炭素源の同化性	
1) L-アラビノース	+
2) D-キシロース	+
3) D-グルコース	+
4) D-フラクトース	+
5) シュクロース	+
6) イノシトール	+
7) L-ラムノース	+
8) ラフィノース	+
9) D-マンニット	+

【表2】

## 各培地における生育状況

培 地	生 育	集落表面 の菌色	基生菌糸 の色 (表)	基生菌糸 の色 (裏)	拡散色素	その他
ショース・アム・アム寒天培地	良 好	白	無 色	無 色	薄肌色	
グロース・アム・アム寒天培地	良 好	白	無 色	無 色	なし	
グロース・アム・アム寒天培地	良 好	白	無 色	無 色	なし	
スター・無機塩寒天培地	良 好	白	無 色	無 色	薄茶色	
チロシン寒天培地	良 好	白	無 色	無 色	薄茶色	バニリンなし
栄養寒天培地	良 好	白	無 色	無 色	なし	
イース・麦芽寒天培地	良 好	白	無 色	無 色	なし	
オートミール寒天培地	良 好	白	無 色	無 色	薄肌色	

【0016】本菌株TOTO-9305株は表1の結果より、形態学的に放線菌、ストレプトミセス属の特徴を有する。また、細胞壁にL-アラビノピメルン酸を含有する等のことから、本菌株はストレプトミセス属に属する一菌種と分類される。

【0017】TOTO-9305株は、各種寒天培地上での菌糸の色調から白色シリーズに属すること、胞子表面は平滑であること、胞子の連鎖はおおむね直状であること、メラニン色素は生成しないこと等の性質を有する。これらの性質と各炭素源の同化性試験の結果をもとに、既知菌種の中から本菌株の類似種をバージェズマニュアル第8版 (Bergey's Manual

of Determinative Bacteriology 8th Ed.) に従って検索を行った。その結果、特に各種炭素源の同化性において本菌株と類似の既知菌種は見いだせないことから、本菌株はストレプトミセス属に属する新菌種である。

【0018】なお、本菌株は工業技術院生命工学工業技術研究所に寄託番号第13640号 (FERM P-13640) のもと寄託されている。

## 【0019】培養条件

上記菌株は好アルカリ性放線菌であるため、その培養はアルカリ領域で行う必要がある。培地をアルカリ性にするための方法としては格別である必要はなく、通常の培

地中に例えば炭酸ナトリウムあるいは炭酸水素ナトリウムを添加するだけで良い。炭素源としてはグルコース、可溶性デンプン、セルロース等の単糖、多糖などを用いることができる。窒素源としては、硝酸塩、アンモニウム塩などの無機物をはじめ、尿素、ペプトン、乾燥酵母、酵母エキス、ダイズ粉、コーンステープリカー、カゼイン、肉エキス、アミノ酸などが用いられる。これらの炭素源や窒素源の他に各種無機塩、例えばマグネシウム塩、カリウム塩、ナトリウム塩、リン酸塩などを必要に応じて添加しても良い。培地に加えるアルカリ源としては、0.5~2.0%程度の炭酸ナトリウム、炭酸水素ナトリウム等の炭酸塩あるいは水酸化ナトリウム、アンモニアなどが使用でき、培地のpHは8.0~11.0程度が望ましい。

【0020】培養は、このような培地中で培養温度20~40℃、好ましくは27~38℃で2日~5日間好氣的に攪拌または振とうしながら行う。

【0021】本発明による新規なアルカリプロテアーゼは、上記のような培養条件のもとで、主として培養液中に分泌され、蓄積される。

#### 【0022】酵素の採取

上記培養液から本発明による酵素を採取、精製するためには、既知の精製法を単独もしくは併用して利用することができる。本酵素は主として菌体外（培養液中）に分泌されるため、例えば濾過あるいは遠心分離で菌体を除去することにより容易に粗酵素液を得ることができる。この粗酵素は、さらに既知の精製法、例えば硫酸などによる塩析；メタノール、エタノール、アセトンなどの有機溶媒による沈殿法；ケラチン等による吸着法；限外濾過；ゲル濾過クロマトグラフィー；イオン交換クロマトグラフィー；疎水クロマトグラフィー、その他の各種クロマトグラフィーを、単独もしくは併用して、精製することができる。

【0023】好ましい精製法を示せば以下の通りである。まず、培養濾液に80%飽和硫酸を添加して塩析を行い、得られた沈殿を緩衝液に溶解する。次いでCM-Toyopearl 650M（東ソー社製）、DEAE-Toyopearl 650M（同社製）によるイオン交換クロマトグラフィーを行うことにより、SDS電気泳動的に均一な精製酵素を得ることができる。

#### 【0024】酵素の性質

本発明によるアルカリプロテアーゼの性質は以下に示される通りである。なお、以下において活性測定法とは次の方法をいうものとする。

【0025】（活性測定法）カゼイン0.6%またはケラチン2%を含む50mMグリシンNaCl/NaOH緩衝液（pH10.5）0.5mlを0.1mlの酵素溶液と混合し、30℃、10分間（ケラチンを基質とした場合は振とうしながら20分間）反応させた後、2.5mlのトリクロロ酢酸混合液（0.11Mトリクロロ

酢酸、0.22M酢酸ナトリウム、0.33M酢酸）を加えて30℃で30分間静置した後、アドバンテック社製濾紙No.5Cで濾過する。次いで、この濾液の0.5mlを2.5mlの0.5M炭酸ナトリウム溶液に加え、さらに3倍希釈したフェノール試薬を0.5ml添加攪拌後、さらに室温にて30分間放置し、660nmの吸光度を測定する。上記の測定条件下で1分間に1マイクログラムのチロシンに相当する吸光度を増加させる酵素量を、酵素活性1単位（1U）と定義する。

#### 【0026】（1）作用および基質特異性

カゼイン、ゼラチン、グルテン、ヘモグロビン、インシュリンなどのタンパク質に作用し、そのペプチド結合をエンド的に加水分解することによりオリゴペプチドおよびアミノ酸を生成する。また、特に従来の酵素では分解の困難であったケラチンなどの不溶性タンパク質をも強力に加水分解する。

#### 【0027】（2）最適pHおよび安定pH

上記の活性測定法にもとづき、本酵素に及ぼすpHの影響を調べた。なお、緩衝液としてKCl/HCl（pH1.0-1.5）、グリシンNaCl/HCl（pH2.0-3.5）、酢酸（pH4.0-5.5）、リン酸（pH6.0-7.0）、トリス/HCl（pH7.5-8.5）、グリシンNaCl/NaOH（pH9.0-11.5）、KCl/NaOH（pH12.0-13.0）を使用した。第1図に活性の最大値を100とした場合の各pHにおける相対活性を示した。第1図により本酵素の最適pHは30℃において11.0-11.5であることが分かる。

【0028】同様に本酵素のpH安定性について第2図に示した。本酵素を各pHの緩衝液中に30℃で24時間保持した後、その残存活性を未処理の酵素活性を100とした相対活性として示した。第2図から、本酵素は上記処理条件下においてpH1.5-12.0までの極めて広範囲のpH域で安定であることが分かる。

#### 【0029】（3）最適温度および安定温度

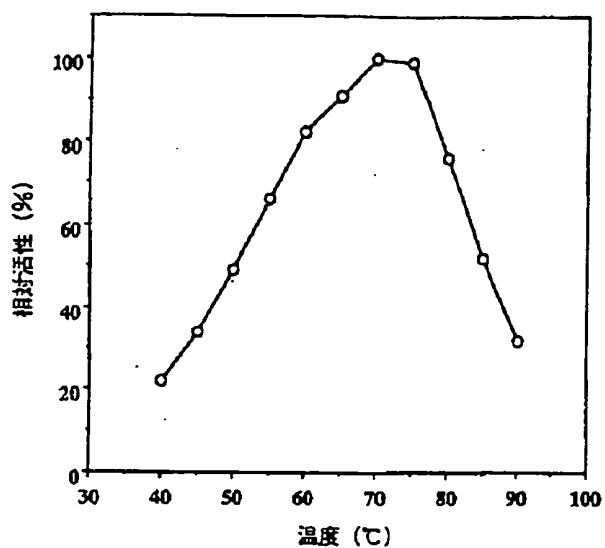
上記活性測定法に準じて、本酵素に及ぼす温度の影響を調べた。第3図に最大活性を100とした場合の各温度における相対活性を示した。第3図から、本酵素の最適温度は70~75℃であることが分かる。

【0030】また、本酵素を50mMトリス塩酸緩衝液（pH7.0）に添加し、40~80℃の範囲の各条件下で10分間保持した後、その残存活性を測定した。測定は5mMの塩化カルシウムを添加した場合としない場合の二通りについて行った。その結果を第4図に示した。第4図により、カルシウム無添加の場合は55℃まで、カルシウムを添加した場合は60℃まで安定であることがわかる。この結果より、本酵素はカルシウムの添加により熱安定性が増加することが判明した。

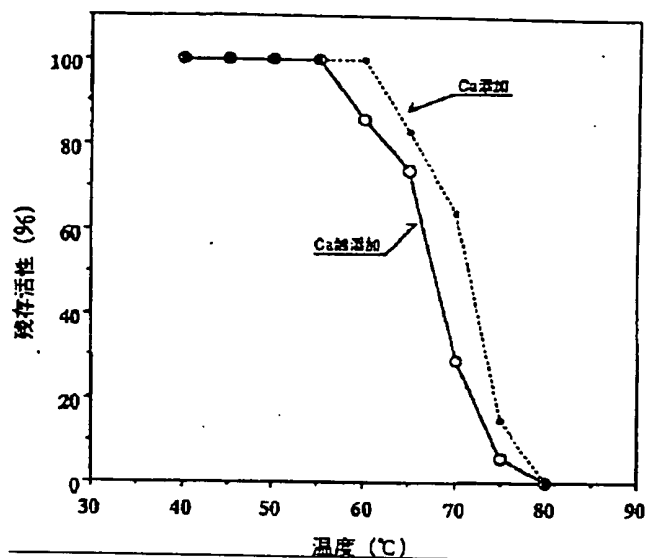
#### 【0031】（4）分子量

本酵素の分子量をSDS電気泳動法により測定したとこ

【図 3】



【図 4】



フロントページの続き

(51) Int. Cl.<sup>6</sup>  
C12R 1:465 )

識別記号 庁内整理番号

F I

技術表示箇所

(72) 発明者 村野 仁美

福岡県北九州市小倉北区中島二丁目1番1  
号 東陶機器株式会社内

(72) 発明者 大崎 有美

福岡県北九州市小倉北区中島二丁目1番1  
号 東陶機器株式会社内